

GLAUCIA DALABONA

**HLA-DRA: UM GENE POLIMÓRFICO EM POPULAÇÕES
INDÍGENAS E MISTAS DO ESTADO DO PARANÁ**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação
para obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.
Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Petzl-Erler

CURITIBA

1997

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
RESUMO	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE	1
1.1.1. <i>Histórico</i>	1
1.1.2. <i>Organização do MHC</i>	1
1.1.3. <i>Estrutura e função dos genes de classe I, II e III</i>	2
1.2. O GENE HLA-DRA.....	5
1.3. OS INDÍGENAS KAINGANG E GUARANI.....	5
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1. POPULAÇÕES ESTUDADAS	8
3.1.1. <i>Populações indígenas</i>	8
3.1.2. <i>População paranaense mestiça</i>	8
3.2. METODOLOGIA	9
3.2.1. <i>Obtenção do material genético</i>	9
3.2.2. <i>Reação em cadeia da DNA polimerase</i>	9
3.2.3. <i>A técnica PCR-SSO</i>	13
3.2.3.1. <i>Hibridação e revelação</i>	13
3.2.3.1.1. <i>Soluções de hibridação, lavagens e revelação</i>	17
3.2.5. <i>A técnica PCR-SSCA</i>	18
3.2.5.1. <i>Preparo e revelação do gel de poliacrilamida</i>	19
3.2.5.1.1. <i>Soluções wazzu para o preparo, impregnação e revelação do gel de poliacrilamida</i>	19
3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	21

4. RESULTADOS	22
4.1. RESULTADOS OBTIDOS PELA TÉCNICA PCR-SSO	22
4.2. RESULTADOS OBTIDOS PELA TÉCNICA PCR-SSCA	25
 5. DISCUSSÃO	 29
5.1. O GENE HLA-DRA	29
5.2. A TÉCNICA PCR-SSO	30
5.3. A TÉCNICA PCR-SSCA	30
 6. CONCLUSÕES	 32
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 33
 APÊNDICE - RESULTADOS DAS TIPAGENS OBTIDOS POR PCR-SSCA E PCR-SSO	 37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa do MHC humano (CAMPBELL e TROWSDALE, 1993).	4
Figura 2. Representação esquemática da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR).....	11
Figura 3. Representação esquemática da revelação de "spot-blot".....	15
Figura 4. Sequência do DNAc dos alelos de HLA-DRA (MARSH e BODMER, 1992) com as respectivas sondas.....	16
Figura 5. Resultados de revelações de HLA-DRA (PCR-SSO) fotocopiados.	24
Figura 6. Resultado de revelação de HLA-DRA (PCR-SSCA) digitalizado por "scanner".	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação e identificação dos alelos de HLA-DRA.	12
Tabela 2. Frequência dos alelos de HLA-DRA encontrada pela técnica PCR-SSO.	23
Tabela 3. Frequência dos alelos de HLA-DRA encontrados pela técnica PCR-SSCA.	27
Tabela 4. Comparação entre os resultados que diferiram entre as tipagens por PCR-SSCA e PCR-SSO.	28

RESUMO

De acordo com a localização no cromossomo, estrutura, função e distribuição tecidual dos produtos dos genes do MHC, os mesmos são agrupados em três classes designadas I, II e III. Os produtos codificados pelos genes de classe I e II, que constituem o sistema HLA, são expressos na superfície das células e possuem papel importante no reconhecimento imunológico. Grande parte dos genes do MHC são polialélicos e com alto grau de polimorfismo, porém, as frequências alélicas variam entre as populações. O gene HLA-DRA possui até o momento apenas dois alelos conhecidos, DRA*0101 e DRA*0102, e o primeiro é considerado monomórfico, embora não existam registros de trabalhos populacionais para o gene. Provavelmente por este motivo, acrescido do fato de que o gene possui apenas dois alelos conhecidos, é que tal consideração tenha sido adotada. Este trabalho teve como objetivos identificar os alelos desse gene e suas frequências nas tribos Kaingang e Guarani, que são distintas e isoladas, e em uma amostra de população não indígena, comparando a distribuição dos alelos nessas populações, bem como as metodologias laboratoriais utilizadas. Foi encontrada uma alta frequência para o alelo DRA*0102 em todas as populações estudadas, e, entre Kaingangs, este alelo chegou a ser mais frequente que o DRA*0101. As frequências encontradas para os alelos DRA*0101 e DRA*0102 foram, respectivamente, 0,6043 e 0,3957 na amostra de população paranaense mista, 0,6923 e 0,3077 na amostra de indígenas Guarani e 0,4580 e 0,5420 na amostra de indígenas Kaingang. Estes resultados sugerem que o gene HLA-DRA seja polimórfico não apenas nas populações estudadas, como também em diversas outras populações do mundo.

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Complexo Principal de Histocompatibilidade

1.1.1. Histórico

A descoberta do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês Major Histocompatibility Complex) ocorreu em murinos, através de observações da rejeição de transplantes entre camundongos de linhagens endogâmicas diferentes. Essas observações, primeiramente realizadas por Gorer em 1936 e depois confirmadas por Snell e colaboradores, na década de 40, levaram a concluir que a rejeição aos transplantes estava ligada ao gene codificador do antígeno II, denominado então histocompatibilidade-2 ou H-2 (ALBERT *et al.*, 1977).

O estudo de várias linhagens congênicas levou à descoberta de vários alelos H-2 e, eventos ocasionais de recombinação sugeriram a existência de outros *loci*, intimamente ligados (ALBERT *et al.*, 1977).

Com a descrição do antígeno Mac (hoje HLA-A2) em leucócitos (DAUSSET, 1958), inicia-se o estudo do MHC humano, que encontra-se em expansão. Um grupo de pesquisadores de todo o mundo reúne esforços em workshops internacionais, realizados periodicamente, onde ocorrem intercâmbio de informações técnicas e científicas sobre histocompatibilidade e que contribuíram para o atual conhecimento do MHC.

1.1.2. Organização do MHC

O Complexo Principal de Histocompatibilidade humano é uma região cromossômica localizada no braço curto do cromossomo 6, na posição 6p21.3, e que ocupa aproximadamente 4000 kilobases (SPIES *et al.*, 1989). O MHC é a região melhor conhecida no genoma humano

e que possui a maior densidade gênica. A recombinação entre os pontos extremos do complexo ocorre com frequência aproximada de 4% (GERAGHTY, 1992).

Devido à proximidade desses genes, o conjunto de alelos presente em um único cromossomo é herdado em uma unidade chamada haplótipo. Portanto, cada indivíduo possui dois haplótipos, recebidos um de cada genitor, sendo que a maioria dos genes de cada haplótipo é expressa de forma codominante.

De acordo com a localização no cromossomo, estrutura, função e distribuição tecidual dos produtos de genes do MHC, o mesmo é subdividido em 3 regiões, denominadas região de classe II (mais centromérica), região de classe I (mais telomérica) e região de classe III (intermediária entre as outras duas) (Fig. 1).

Os produtos dos genes de classe I e II são expressos na superfície das células, e, como em humanos foram primeiramente descritos em leucócitos (DAUSSET, 1958), foram denominados Antígenos Leucocitários Humanos ou HLA. Os polipeptídeos codificados pelos genes do sistema HLA possuem papel fundamental na resposta imune a antígenos protéicos mediada por linfócitos T, pois somente quando os fragmentos antigênicos estão ligados à moléculas do sistema HLA é que as células T podem reconhecer os antígenos (vide ROITT *et al.*, 1993 e ABBAS *et al.*, 1994).

1.1.3. Estrutura e função dos genes de classe I, II e III

- Classe I

A região de classe I do MHC inclui 34 genes e pseudogenes, que são divididos em clássicos (HLA-A, HLA-B e HLA-C) e não clássicos (como HLA-E, HLA-F, HLA-G e HLA-H) (CAMPBELL e TROWSDALE, 1993; BODMER *et al.*, 1995).

As moléculas de classe I são heterodímeros compostos por uma cadeia leve (β) de aproximadamente 12 kDa, ligada não covalentemente a uma cadeia pesada (α) de aproximadamente 45 kDa. Apenas a cadeia α é codificada por genes do MHC, a cadeia β , denominada β_2 -microglobulina, é codificada por um gene localizado no cromossomo 15 (vide ABBAS *et al.*, 1994).

Os produtos dos genes clássicos são expressos na superfície de quase todas as células nucleadas e plaquetas. Possuem como função apresentar peptídeos derivados de proteínas sintetizadas intracelularmente, aos linfócitos T citotóxicos.

Ao contrário dos genes clássicos, pouco se sabe a respeito da expressão e função dos não clássicos. Porém, especula-se que em relação à expressão de moléculas HLA-G, estas poderiam ter alguma importância na gravidez, como proteger o feto de uma resposta imunológica da mãe (MORRIS *et al.*, 1994).

• Classe II

Na região de classe II já foram descritos mais de 35 genes, dentre os quais estão os genes HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP, genes transportadores de antígenos processados (TAP1 e TAP2), genes dos proteossomos (LMP2 e LMP7), além de outros, alguns de função ainda não conhecida (CAMPBELL e TROWSDALE, 1993; BODMER *et al.*, 1995).

Os produtos de classe II são heterodímeros $\alpha\beta$ associados não covalentemente, mas ao contrário dos produtos de classe I, ambas as cadeias são codificadas por genes do sistema HLA. As cadeias α (30 a 34 kDa) e β (20 a 29 kDa) são codificadas por genes A e B, respectivamente (MORRIS *et al.*, 1994). Estes genes, distribuídos em sub-regiões distintas, são chamados de HLA-D, seguidos da letra que designa a sub-região (P, N, M, O, Q ou R) e da letra A ou B que indica a cadeia α ou β , e também de um número, quando existe mais de um gene ou pseudogene A ou B, como HLA-DRA e HLA-DRB1.

As moléculas HLA de classe II possuem distribuição restrita a algumas células, principalmente células apresentadoras de antígenos. A função dessas moléculas é apresentar fragmentos peptídicos antigênicos aos linfócitos T auxiliares.

• Classe III

A região de classe III é a menos conhecida dentre as três regiões do MHC humano. Possui ao menos 39 genes, dos quais aproximadamente 25 ainda são de função desconhecida (CAMPBELL e TROWSDALE, 1993; BODMER *et al.*, 1995).

Nesta região estão incluídos genes de proteínas que fazem parte do sistema complemento, e genes que codificam para o Fator de Necrose Tumoral (TNF) α e β .

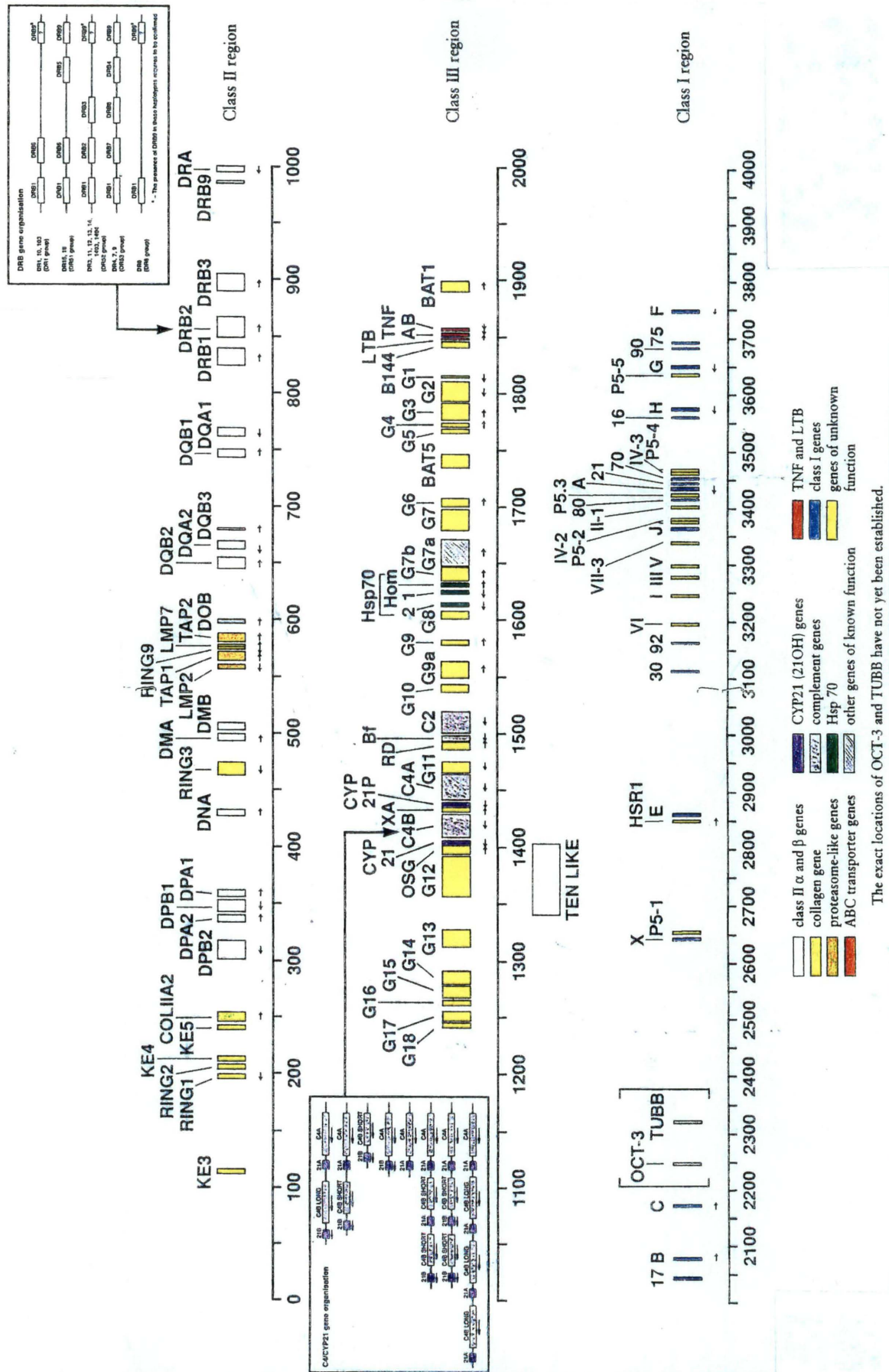


Figura 1. Mapa do MHC humano (CAMPBELL e TROWSDALE, 1993).

1.2. O gene HLA-DRA

A cadeia α das moléculas HLA-DR é codificada pelo gene HLA-DRA, que até o presente momento possui apenas dois alelos conhecidos, DRA*0101 e DRA*0102 (BODMER *et al.*, 1995).

De acordo com as frequências dos alelos nas populações, estes podem ser classificados em 3 categorias: idiomorfos, com frequência inferior a 1%; polimorfos, com frequência entre 1% e 99%; e monomorfos, que possuem frequência superior a 99%. Portanto, um gene polimórfico tem pelo menos um alelo polimorfo, em uma dada população, e um gene monomórfico não apresenta alelos polimorfos. Alelos idiomorfos ocorrem nos dois sistemas (cf. SALZANO e CALLEGARI-JACQUES, 1988). No entanto, as frequências dos alelos diferem de uma população a outra.

Como há grande interesse no estudo de genes polimórficos, não foram encontrados na literatura registros de estudos populacionais para o gene HLA-DRA, cujo alelo DRA*0101 é considerado monomórfico. Esta consideração foi adotada, quase como uma “crença”, provavelmente pelo fato deste gene possuir apenas dois alelos e também pela já citada ausência de estudos populacionais para o mesmo.

1.3. Os indígenas Kaingang e Guarani

As populações Kaingang e Guarani são os dois principais grupos indígenas do sul do Brasil. Essas populações constituem comunidades de identidade étnica e de características bastante individuais, sendo que os Kaingang pertencem à família lingüística Gê e os Guarani, à família lingüística Tupi-Guarani. Além disso, ambas as tribos tendem a permanecer predominantemente endogâmicas (PETZL-ERLER *et al.*, 1993).

As tribos Kaingang e Guarani são objeto de estudo do nosso grupo de pesquisa desde 1988, e resultados para uma série de *loci* do MHC, e outros, já foram publicados ou submetidos para publicação (GUERRA *et al.*, 1992; BELICH *et al.*, 1992; PETZL-ERLER *et al.*, 1993; MESSIAS *et al.*, 1993; PANDO *et al.*, 1994; PETZL-ERLER e McDEVITT, 1994;

SALZANO *et al.*, 1997; WEG-REMERS *et al.*, 1997; PETZL-ERLER *et al.*, 1997 e PARHAM *et al.*, 1997).

Por tratar-se de populações isoladas, os Kaingang e os Guarani apresentam um limitado polimorfismo do MHC quando comparado aos grandes grupos étnicos, como caucasóides (PETZL-ERLER *et al.*, 1993). Porém, o estudo populacional comparativo do sistema HLA contribui na elucidação das relações históricas entre grupos populacionais; e o estudo de populações indígenas é extremamente informativo, por apresentarem características únicas em sua história e cultura.

Estudos moleculares permitiram a descoberta de novos alelos entre os Kaingang e os Guarani (BELICH *et al.*, 1992; PETZL-ERLER *et al.*, 1993; PETZL-ERLER e McDEVITT, 1994), e, como esses alelos ou são exclusivos destas populações ou são compartilhados apenas com outras populações indígenas sul-americanas, possivelmente não estavam presentes nos grupos fundadores, mas surgiram nestas populações e foram mantidos devido aos novos fatores ecológicos encontrados por estes grupos durante sua migração pelo continente americano (BELICH *et al.*, 1992).

2. OBJETIVOS

Este trabalho possui os seguintes objetivos:

-identificar os alelos HLA-DRA existentes nas populações indígenas Kaingang e Guarani, bem como em uma amostra de população paranaense mista;

-calcular as frequências alélicas nas populações estudadas;

-comparar a distribuição dos alelos entre as populações estudadas e com a de outras populações de todo o mundo;

-comparar diferentes metodologias para tipagem dos alelos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Populações Estudadas

3.1.1. Populações indígenas

Os Kaingang e os Guarani são os principais grupos indígenas do sul do Brasil e formam comunidades que são culturalmente distintas e que tendem a permanecer endogâmicas (PETZL-ERLER *et al.*, 1993).

No Estado do Paraná, destacam-se na preservação dos costumes indígenas duas áreas de reserva, que são as áreas do Rio das Cobras e do Ivaí. Destas reservas é que foram obtidas as amostras indígenas para o presente estudo.

Foram analisadas 91 amostras de Guarani e 109 de Kaingang da reserva do Rio das Cobras, e 129 amostras de Kaingang da reserva de Ivaí, identificadas respectivamente como GRC, KRC e KIV.

O material biológico a ser estudado, o DNA, foi obtido a partir do sangue coletado destes indivíduos, pela equipe do Laboratório de Imunogenética da UFPR, em 1988, quando foram coletadas também informações sobre as tribos. A extração e purificação do DNA genômico foi feita no Laboratório de Genética Molecular Humana durante os anos de 1988 e 1989.

3.1.2. População paranaense mista

O Laboratório de Genética Molecular Humana da Universidade Federal do Paraná possui um painel composto atualmente por 139 amostras de DNA de população paranaense não indígena, constituída por grupos étnicos variados (58,27% de caucasóides, 0,72% de negróides, 9,35% de orientais, 17,99% de mestiços e 13,67% de etnia não identificada). São voluntários que se dispõem a doar amostras de sangue periodicamente.

As amostras que compõem este painel é que representaram a população paranaense mista no presente trabalho.

3.2. Metodologia

3.2.1. Obtenção do material genético

As amostras de DNA genômico foram extraídas de leucócitos de sangue periférico e purificadas através da técnica do fenol/clorofórmio (MANIATIS *et al.*, 1982). As soluções concentradas obtidas são armazenadas a -70°C, e, destas soluções são preparadas outras diluídas (20 µg DNA / ml), para uso, que são mantidas a aproximadamente 4°C durante o período em que estão sendo realizadas amplificações e a -20°C nos intervalos de tempo em que não estão sendo utilizadas.

3.2.2. Reação em cadeia da DNA polimerase

O processo de amplificação do gene de interesse é feito através da PCR (polymerase chain reaction), e a posterior análise é feita pelas técnicas PCR-SSO (sequence specific oligonucleotide) e PCR-SSCA (single strand conformation analysis). A PCR é basicamente a realização de vários ciclos com 3 etapas cada um. Estas etapas ocorrem por diferença de temperatura. Na primeira etapa, a temperatura é elevada a 94°C e o DNA é desnaturado. Na segunda, a temperatura baixa para 55°C e os oligonucleotídeos iniciadores, um sense e um anti-sense, também chamados primers, ligam-se aos locais específicos da fita de DNA onde as seqüências de nucleotídeos são complementares a eles. Na terceira etapa, a 72°C, tem-se o alongamento da região da fita à qual os primers ligaram-se. Ao final de vários ciclos tem-se milhões de cópias da seqüência específica do DNA (uma representação deste processo pode ser observada na Figura 2).

A mistura de reação para amplificação contém 0,25 µg de DNA genômico, 9 pmoles de cada um dos primers (Tab. 1), 1X de Tampão (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM KCl; 0,1

mg/ml de gelatina, 0,02% NP-40), 0,2 mM de dNTP, 2 mM de $MgCl_2$ e 0,75 U de Taq polimerase, em um volume final de 30 μ l, que foi completado com água Mili-Q.

As amostras foram submetidas a 30 ciclos de PCR, cada qual consistindo de 1 min a 94°C para desnaturação, 1 min a 55°C para anelamento dos primers e 1 min a 72°C para o alongamento da cadeia. Antes do início da ciclagem, foi feito um passo extra de 4 min a 94°C para total desnaturação das fitas molde e no final da ciclagem, as amostras foram mantidas a 72°C por um período adicional de 10 min para garantir o alongamento das cópias.

Após a amplificação, para verificar a qualidade da PCR, 5 μ l do produto são misturados com 2 μ l de solução corante (37,5% de sucrose; 0,1% de azul de bromofenol; 0,5% de SDS; 50 mM de EDTA; e 50 mM de Tris-HCl pH 7,6). A mistura é submetida à eletroforese, em gel de agarose 1%. A solução corante é utilizada para acompanhar a corrida, de aproximadamente 1 h, do material no gel, que então é corado por 30 min em solução de brometo de etídeo para que possa ser feita a visualização em transiluminador, através de luz ultra-violeta.

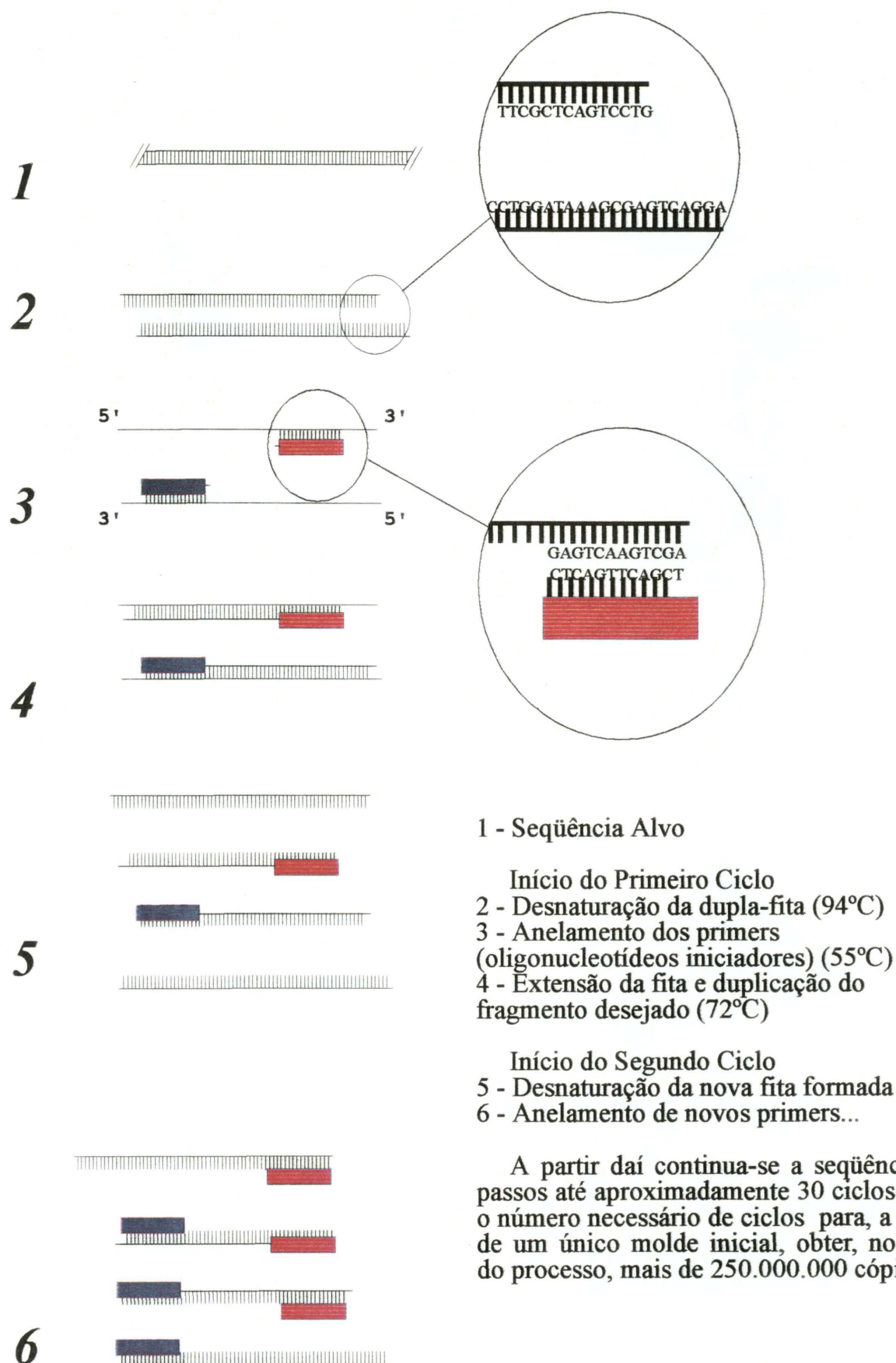


Figura 2. Representação esquemática da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação e identificação dos alelos de HLA-DRA.

		Seqüência	Alelo que identifica
Oligonucleotídeo-sonda	DRA 1971 W	5'-TGTGTGCCTTGGGCCTGA-3'	DRA*0102
	DRA 1972 W	5'-TGTGTGCCCTGGGCCTGA-3'	DRA*0101
	DRA 2171W	5'-TCAAGGGATTGCGCAAAA-3'	DRA*0102
	DRA 2172W	5'-TCAAGGGAGTGCACAAAA-3'	DRA*0101
Oligonucleotídeo iniciador	DRACYampA	5'-CCAGAGTTTGATGCTCCAAG-3'	-
	CYDRAampB	5'-ACCTAACTCACCTCCATGTG-3'	-

FONTE: manual técnico do 12º WORKSHOP INTERNACIONAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (1994)

3.2.3. A técnica PCR-SSO

Através desta técnica, após a amplificação, com o produto de PCR que se obtém são feitas hibridações e revelações para tipagem dos alelos. A realização destes processos é feita baseada no manual técnico do 12º WORKSHOP INTERNACIONAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE (1994).

3.2.3.1. Hibridação e revelação

Os produtos de PCR (1 a 2 µl de cada amostra) são aplicados em membranas de nylon, na forma de “spot-blots”. Para que ocorra a desnaturação do DNA, as membranas são lavadas em solução de NaOH 0,4 N por 5 min e depois ficam 10 min em SSPE 3X. A fixação do material é feita através do calor, deixando as membranas a 80°C por 1 h. Após a fixação, as membranas são colocadas em tubos próprios para hibridação.

Os processos de hibridação e revelação ocorrem em um forno de hibridação, onde os tubos com as membranas ficam girando e a temperatura é regulada de acordo com o processo.

Aos tubos, acrescenta-se SSPE 4X para hidratação das membranas, que ficam no forno por 15 min, a uma temperatura de 50°C, que permanecerá constante até o final do processo de hibridação. Esta solução é retirada e coloca-se solução de TMAC, durante 30 min, para fazer uma pré-hibridação. Depois, as membranas entram em contato, por 1 h no mínimo, com solução de oligonucleotídeo-sonda biotinilado, que irá hibridar com o DNA da membrana.

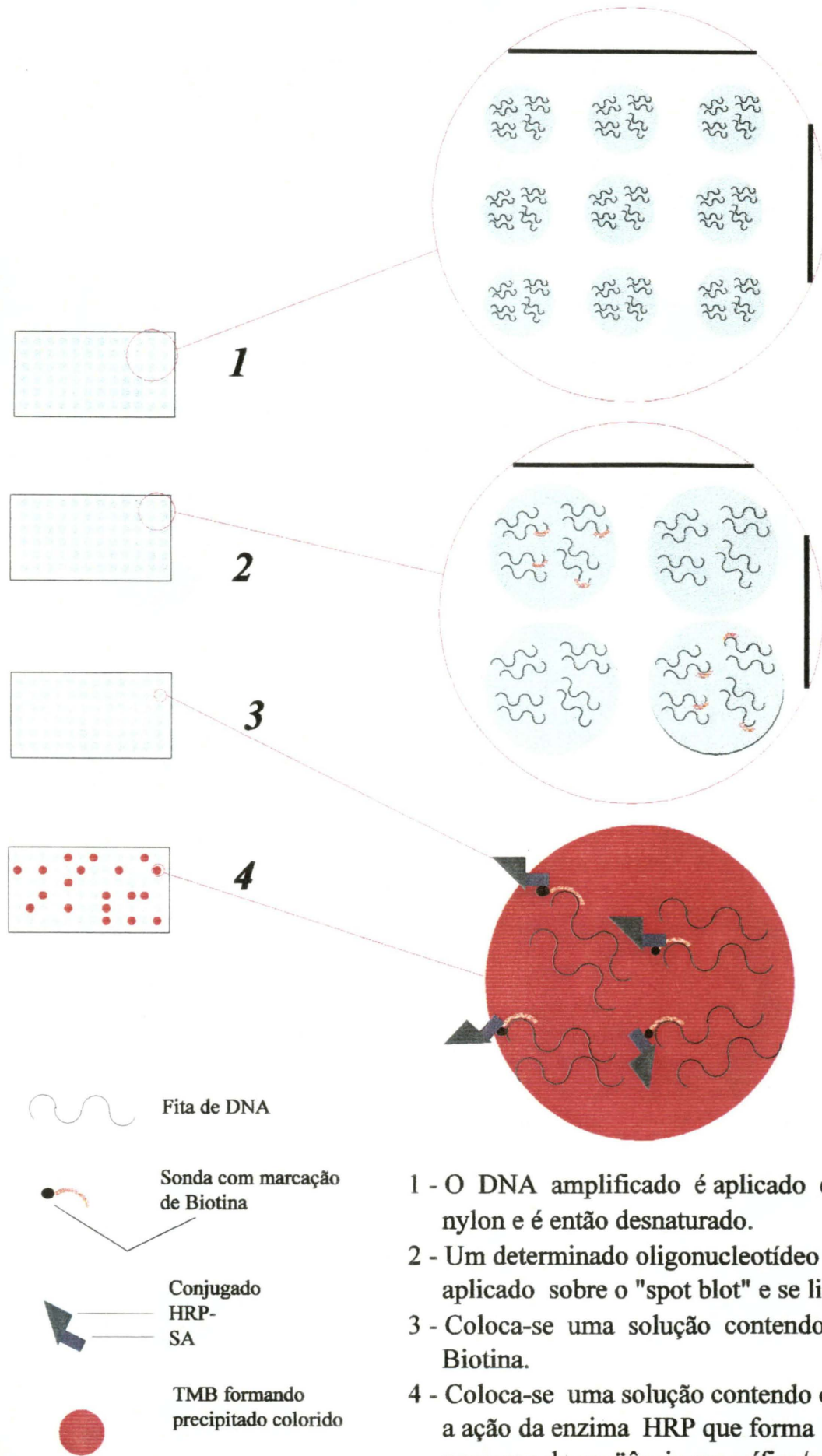
Após a hibridação, são feitas lavagens de alta e baixa estringência para retirar o excesso de sonda. Para a lavagem de baixa estringência, a temperatura é abaixada para 37°C e acrescenta-se aos tubos a solução A, por duas vezes de 10 min, para que a mesma retire as sondas que não hibridaram com o DNA. Na alta estringência, a temperatura é elevada para 59°C e acrescenta-se solução de TMAC por 20 min. Nessas condições, são retiradas as sondas que podem ter se ligado inespecificadamente a seqüências não totalmente complementares, que diferem em uma ou mais bases da seqüência alvo, devendo restar apenas sondas acopladas a amostras com seqüência perfeitamente complementar à sonda.

Segue-se a revelação, que permite identificar quais as amostras reagiram com a sonda. Para isso, a uma temperatura de 37°C, a membrana é preparada em SSPE 3X + SDS 0,5% por

10 min para receber uma solução com o conjugado HRP-SA (horseradish peroxidase - streptavidin conjugate). Esta solução permanece por 30 min em contato com a membrana e liga-se à sonda biotinilada, pois a estreptoavidina (SA) tem alta afinidade pela biotina. A enzima HRP catalisa uma reação cujo substrato é o TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametil benzidina).

Para retirar o excesso de HRP-SA são feitas duas lavagens, de 10 min cada, com SSPE 1X + SDS 0,1%, e para deixar a membrana em pH adequado para a ação da HRP sobre o substrato TMB, é feita uma lavagem de 5 min com tampão citrato. Só então é acrescida a solução de TMB e o resultado da reação com a HRP é uma coloração azulada nas amostras onde a sonda permaneceu acoplada (Fig. 3).

Para caracterização dos alelos foi utilizado um conjunto de 4 oligonucleotídeos-sonda, 2 para identificar o alelo DRA*0101 e 2 para identificar o alelo DRA*0102 (Fig. 4) (Tab.1). Os resultados positivos e negativos permitem identificar qual ou quais alelos cada amostra possui.



- 1 - O DNA amplificado é aplicado em uma membrana de nylon e é então desnaturado.
- 2 - Um determinado oligonucleotídeo marcado com Biotina é aplicado sobre o "spot blot" e se liga de forma específica.
- 3 - Coloca-se uma solução contendo HRP-SA que se liga a Biotina.
- 4 - Coloca-se uma solução contendo o substrato (TMB) para a ação da enzima HRP que forma um precipitado azul na presença da sequência específica/sonda biotinilada.

Figura 3. Representação esquemática da revelação de "spot-blot".



Figura 4. Sequência do DNAC dos alelos de HLA-DRA (MARSH e BODMER, 1992) com as respectivas sondas.

3.2.3.1.1. Soluções de hibridação, lavagens e revelação

Soluções estoque:

- SSPE 20X

2,0 M de NaCl

0,2 M de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$

20 mM de EDTA (ácido etilenodiaminetetracético dissódico)

- ajustar o pH em 7,4 com solução de NaOH 10 N

- SDS 10% (sulfato dodecil de sódio)

- Tris-HCl pH 8,0

1M de Tris (hidroximetilaminometano)

- ajustar o pH em 8,0 com HCl concentrado

Soluções de uso:

- SSPE 4X

- Solução de TMAC

50 mM de Tris-HCl pH 8,0

3 M de TMAC (cloreto de tetrametilamônio)

2 mM de EDTA

0,1% de SDS

- Solução com a sonda

2 pmoles de sonda por ml de solução de TMAC

- Solução A

SSPE 2X

0,1% de SDS

- SSPE 3X - SDS 0,5%

- Solução com HRP-SA

0,5 µg de HRP-SA por ml de SSPE 3X - SDS 0,5%

- SSPE 1X - SDS 0,1%

- Tampão citrato

0,1 M de $C_6H_6Na_3O_7 \cdot 2H_2O$

- Solução de TMB

0,133 mg de TMB por ml de tampão citrato

1% de H_2O

3.2.5. A técnica PCR-SSCA

Através desta técnica, a tipagem dos alelos é feita de acordo com as diferentes bandas formadas pelas fitas simples de DNA num gel de poliacrilamida. Considerando-se que o material aplicado está desnaturado e que cada fita simples possui uma determinada conformação, diferente para cada alelo, através das bandas resultantes pode-se determinar o genótipo. Amostras controles, já tipadas para HLA-DRA, que compõem o painel do workshop, foram utilizadas para estabelecer os padrões correspondentes aos genótipos. Os procedimentos realizados foram modificados a partir dos descritos por ORITA *et al.* (1989).

3.2.5.1. *Preparo e revelação do gel de poliacrilamida*

O produto de PCR é misturado com uma solução corante (95% de formamida; 0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xileno cianol; 10 mM de EDTA 0,4 M; e 10 mM de NaOH 3 M) e então é desnaturado pelo calor (96°C) e imediatamente resfriado (posto em contato com gelo) para evitar o anelamento das fitas. Logo em seguida, é aplicado em um gel de poliacrilamida 7,5%. As amostras são agora submetidas à eletroforese, por 19 h a 21 h, numa temperatura de 4°C.

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UFPR

Após a corrida do material, o gel entra em contato com solução de HNO₃ 1% para retirar o excesso de corante, por 3 min. A solução é retirada, lava-se rapidamente o gel com água destilada e acrescenta-se solução de AgNO₃, por 20 min. O nitrato de prata tem afinidade pelo DNA e fica impregnado no mesmo.

Após a retirada da última solução, lava-se novamente o gel com água destilada e para que ocorra a revelação utiliza-se 170 ml de solução de Na₂CO₃ acrescida de 92 µl de formaldeído. Um terço desta solução é colocada sobre o gel e permanece por aproximadamente 30 s, até que fique escura, e então é retirada. Acrescenta-se o restante da solução que ficará em contato com o gel até que sejam visualizadas as bandas. Para a interrupção do processo, a solução reveladora é retirada, lava-se o gel com água destilada e acrescenta-se ácido acético 10%, por 10 min. Através da observação das bandas obtidas e do padrão que as mesmas apresentam, pode-se inferir os genótipos para cada amostra aplicada.

3.2.5.1.1. Soluções para o preparo, impregnação e revelação do gel de poliacrilamida

Soluções estoque:

• Solução de acrilamida 50:1

49 partes de acrilamida para 1 parte de N, N'-metilenobisacrilamida
5% de glicerol

- Solução reveladora

14,8 g de Na_2CO_3 por 500 ml de solução

Soluções de uso:

- Gel de poliacrilamida 7,5%

360 μl de APS 10%

36 μl de TEMED

10 ml de TBE 5X

7,5 ml de solução de acrilamida 50:1

- volume final: 50 ml de solução

- APS 10% (persulfato de amônio)

- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletenodiamina)

- TBE 5X

54 g de Tris Base

27,5 g de ácido bórico

20 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0

- volume final: 1000 ml de solução

- HNO_3 1%

- Solução de AgNO_3

2,02 g de AgNO_3 por 1000 ml de solução

- Solução reveladora

170 ml da solução reveladora estoque

92 μl de formaldeído

3.3. Análise estatística

Através do número total de indivíduos tipados e do número de indivíduos encontrado para cada classe genotípica, e considerando-se a codominância para os alelos HLA-DRA, por contagem direta puderam ser calculadas as frequências alélicas.

De posse das frequências alélicas, foram calculadas as frequências genotípicas esperadas. Estas, foram comparadas às frequências genotípicas observadas, para verificação do Equilíbrio de Hardy e Weinberg, através da fórmula $(p + q)^2$, e do teste do qui-quadrado.

Como as amostras de Kaingang são provenientes de duas áreas de reserva distintas, primeiramente foi feito um teste de homogeneidade, através do teste do qui-quadrado, para verificar se os dados de ambas as amostras poderiam ser tratados como se fossem uma amostra única.

4. RESULTADOS

Foi analisada uma amostra de 468 indivíduos, composta por 109 KRC, 129 KIV, 91 GRC e 139 indivíduos que fazem parte da população paranaense mista não indígena. Todos foram tipados pela técnica PCR-SSCA, e, 56 amostras de KRC, 56 de KIV, 56 de GRC e 98 da população mista foram tipadas também pela técnica PCR-SSO.

4.1. Resultados obtidos pela técnica PCR-SSO

Para a tipagem das amostras foi utilizado um conjunto de 4 oligonucleotídeos-sonda, 2 para identificar o alelo DRA*0101 e 2 para o alelo DRA*0102. Foram tipadas 98 amostras da população paranaense mista, 56 de KRC, 56 de KIV e 56 de GRC.

Duas sondas, DRA 1971W e DRA 1972W, demonstraram ser ineficientes e não puderam ser consideradas para a realização da tipagem, que então foi feita considerando-se apenas os resultados das sondas DRA 2171W e DRA 2172W (Fig. 5).

As frequências encontradas para os alelos nas populações estudadas podem ser visualizadas na Tabela 2.

As amostras de população Kaingang de Ivaí e de Rio das Cobras, quando comparadas através de um teste de homogeneidade, não diferiram significativamente, portanto, mesmo pertencendo a áreas de reserva diferentes, puderam ser consideradas como uma amostra única.

Todas as amostras populacionais encontram-se em equilíbrio de Hardy e Weinberg.

Tabela 2. Frequência dos alelos de HLA-DRA encontrada pela técnica PCR-SSO.

Amostra populacional	Alelos	
	DRA*0101	DRA*0102
Paranaense mista (n=196)	0,5990	0,4010
KRC (n=112)	0,4000	0,6000
KIV (n=112)	0,4732	0,5268
GRC (n=112)	0,6132	0,3868

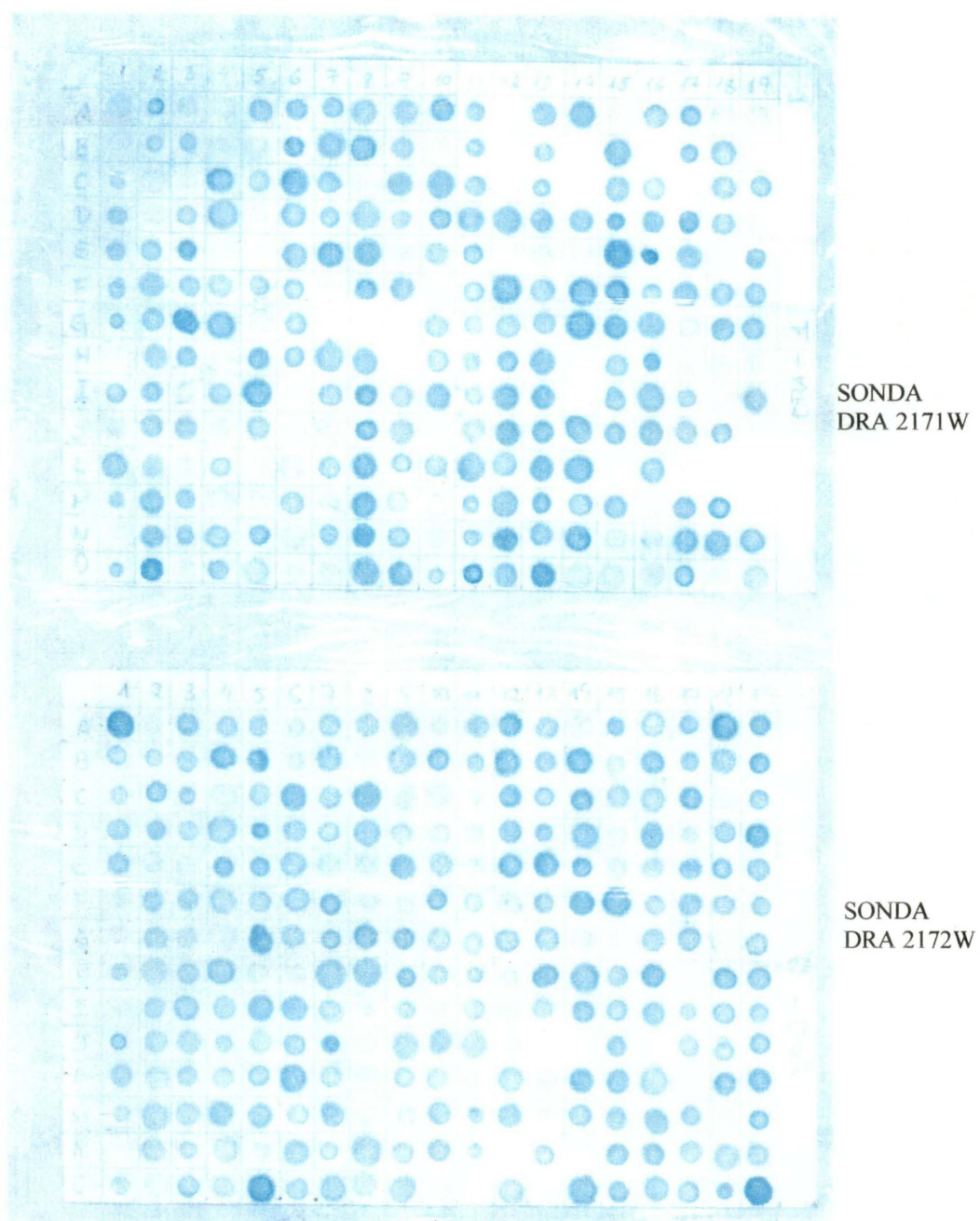
Legenda:

KRC - amostra de população Kaingang da reserva de Rio das Cobras

KIV - amostra de população Kaingang da reserva de Ivaí

GRC - amostra de população Guarani da reserva de Rio das Cobras

n - número de alelos em cada amostra populacional



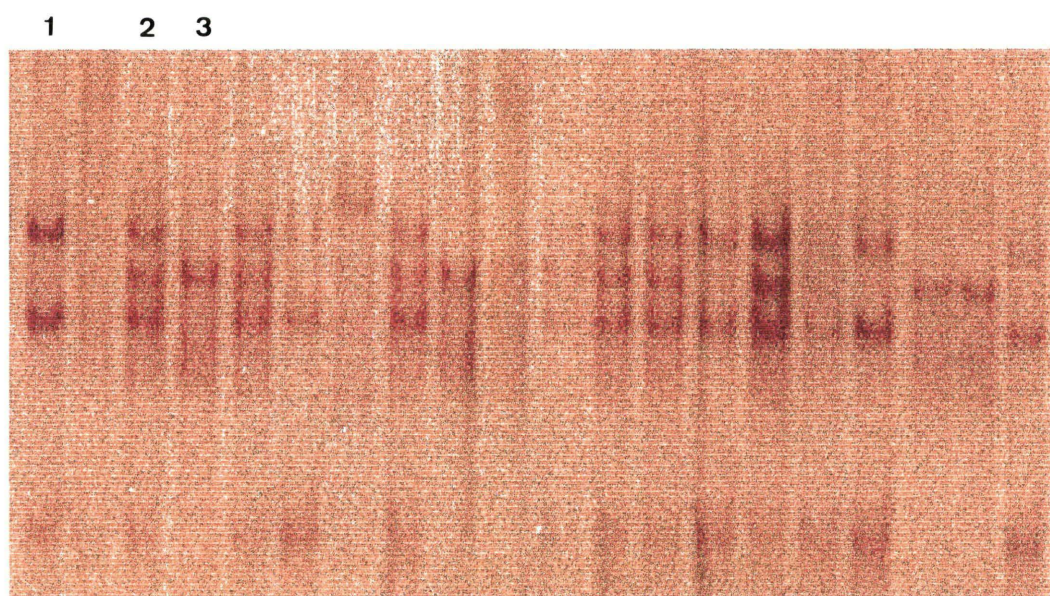
4.2. Resultados obtidos pela técnica PCR-SSCA

Todos os 468 indivíduos que compõem a amostra foram tipados por esta técnica. Um exemplo de visualização dos resultados pode ser observado na Figura 6 e as frequências alélicas obtidas constam na Tabela 3.

Houveram algumas discordâncias entre os resultados provenientes das técnicas PCR-SSCA e PCR-SSO, que podem ser verificadas na Tabela 4. Duas amostras, o correspondente a 0,75% do total tipado por PCR-SSO, não puderam ser tipadas por esta técnica; 4 amostras (1,50%) tiveram resultado duvidoso e 10 amostras (3,76%) apresentaram genótipo diferente do obtido pela técnica PCR-SSCA. Estas discordâncias podem ser resultado de contaminação durante manipulação e/ou pelo fato das tipagens por PCR-SSO terem sido realizadas com base em apenas duas sondas.

Apesar das diferenças encontradas, as frequências alélicas obtidas através das duas técnicas não diferem significativamente ($0,70 < P < 0,80$).

Novamente verificou-se o equilíbrio de Hardy e Weinberg em todas as amostras populacionais e as duas amostras de Kaingang puderam ser consideradas como uma amostra única, pois não diferiram significativamente em um teste de homogeneidade.



Padrão 1: genótipo 0102/0102

Padrão 2: genótipo 0101/0102

Padrão 3: genótipo 0101/0101

Figura 6. Resultado de revelação de HLA-DRA (PCR-SSCA) digitalizado por “scanner”.

Tabela 3. Frequência dos alelos de HLA-DRA encontrados pela técnica PCR-SSCA.

Amostra populacional	Alelos	
	DRA*0101	DRA*0102
Paranaense mista (n=278)	0,6043	0,3957
KRC (n=218)	0,4266	0,5734
KIV (n=258)	0,4845	0,5155
GRC (n=182)	0,6923	0,3077

Legenda:

KRC - amostra de população Kaingang da reserva de Rio das Cobras

KIV - amostra de população Kaingang da reserva de Ivaí

GRC - amostra de população Guarani da reserva de Rio das Cobras

n - número de alelos em cada amostra populacional

Tabela 4. Comparação entre os resultados que diferiram entre as tipagens por PCR-SSCA e PCR-SSO.

Indivíduo	Tipagem por PCR-SSCA	Tipagem por PCR-SSO
26 JML	0101/0102	não identificou
28 LAF	0101/0102	0102/0102
43 MLP	0101/0101	0101/0101 ou 0101/0102
KCR 018	0101/0102	0102/0102
KRC 026	0101/0102	0101/0101 ou 0101/0102
KRC 044	0101/0102	0102/0102
KIV 027	0101/0102	0102/0102
KIV 034	0101/0102	0101/0101
KIV 038	0101/0101	0101/0102
GRC 135	0102/0102	0102/0102 ou 0101/0102
GRC 153	0101/0101	não identificou
GRC 157	0101/0102	0101/0101
GRC 158	0101/0102	0102/0102
GRC 163	0101/0102	0102/0102
GRC 167	0101/0102	0102/0102
GRC 191	0101/0101	0101/0101 ou 0101/0102

5. DISCUSSÃO

5.1. O gene HLA-DRA

Os resultados demonstraram, nas populações estudadas, que mesmo não sendo alto o grau de polimorfismo para o gene HLA-DRA que apresentou apenas dois alelos, o mesmo não é monomórfico como se pensava até então.

Como as frequências dos alelos variaram entre as populações estudadas e como a população paranaense mista também apresentou alta frequência para o alelo DRA*0102 (0,3957), acredita-se que haja variabilidade na frequência desses alelos em outras populações do mundo e que ao menos em grande parte dessas populações, o gene HLA-DRA também não seja monomórfico.

Até o momento, não há registro de outros trabalhos populacionais para esse gene, o que por um lado, releva a importância deste trabalho, mas por outro, envolve a perda da possibilidade de comparação com outros dados.

Os desvios encontrados entre as frequências dos alelos para as populações Kaingang e Guarani são altamente significativos ($\Sigma\chi^2 = 11,2340$), denotando a diferença entre as duas tribos como já descrito também para outros genes como HLA-A, HLA-B, HLA-C e HLA-DRB (BELICH *et al.*, 1992; PETZL-ERLER *et al.*, 1993; PETZL-ERLER e McDEVITT, 1994; PETZL-ERLER *et al.*, 1997). Os desvios também são significativos ao comparar a população mista com Kaingang ($\Sigma\chi^2 = 4,2979$), mas não são significativos ao se comparar a primeira com Guarani ($0,20 < P < 0,50$).

Todas as amostras populacionais estudadas estão em equilíbrio de Hardy e Weinberg, o que sugere que as frequências genotípicas encontradas estão estáveis nas populações, não havendo ação detectável de fatores evolucionários como seleção natural ou migração, por exemplo.

5.2. A técnica PCR-SSO

Esta técnica apresenta como vantagem em relação à PCR-SSCA, a possibilidade de tipar um grande número de indivíduos de uma vez.. Porém, para tipagem de HLA-DRA, a PCR-SSO apresentou problemas e a PCR-SSCA mostrou-se mais eficaz.

O principal problema foi a impossibilidade de interpretação dos resultados de duas sondas, sendo a tipagem realizada com base no resultado apenas das outras duas sondas. Uma hipótese para a não atuação das sondas é que elas não tenham sido corretamente sintetizadas pela firma fornecedora.

Como a tipagem foi feita apenas com os resultados de duas sondas, já se esperavam os resultados duvidosos listados na Tabela 4, em decorrência dos falsos positivos e falsos negativos que ocorrem nas membranas. Provavelmente, se as outras sondas tivessem bons resultados, as amostras que ficaram com genótipo duvidoso teriam sido definidas.

Além das amostras que tiveram resultado duvidoso (1,50% do total de amostras tipadas por PCR-SSO) também ocorreram amostras que não hibridaram com nenhuma das sondas e não puderam ser tipadas (0,75%), e amostras que apresentaram genótipo diferente do resultante por PCR-SSCA (3,76%). Como foram poucas as amostras que apresentaram esses resultados, os mesmos podem ser atribuídos a contaminação do material durante a manipulação e/ou falta do resultado para interpretação das sondas DRA 1971W e DRA 1972W.

5.3. A técnica PCR-SSCA

Como já mencionado, uma desvantagem desta técnica é o número reduzido de indivíduos que podem ser tipados em cada gel, o que torna a tipagem demorada. Porém, tem-se o genótipo de cada amostra aplicada já na revelação do gel, ao contrário da PCR-SSO que após a revelação, faz-se a leitura dos resultados para cada sonda e, depois, comparando os resultados é que se infere o genótipo.

A PCR-SSCA apresenta ainda outras vantagens. Através desta técnica não há dúvidas em relação ao genótipo da amostra, devido ao padrão de bandas. Também pelo motivo de cada

genótipo apresentar um determinado padrão de bandas, esta técnica permite a identificação de alelos novos.

Outro aspecto é que esta técnica requer menos cuidados e tempo dispendido em relação à PCR-SSO, sendo menos trabalhosa em pequena escala. Contudo, a PCR-SSCA é uma técnica que se adequa muito bem à tipagem de genes com poucos alelos, mas provavelmente seria inadequada para genes com muitos alelos devido ao grande número de padrões resultantes e que poderiam dificultar a interpretação, além de requerer controles muito bem definidos para cada padrão.

6. CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos através do presente trabalho, podem ser inferidas as seguintes conclusões:

O gene HLA-DRA apresenta grau relativamente baixo de polimorfismo, contudo, não é monomórfico nas populações estudadas.

A frequência dos alelos variou entre as populações estudadas, levando-nos a supor que seja variável em outras populações do mundo e, que ao menos em grande parte delas, o gene seja polimórfico.

Diferentes metodologias empregadas para a tipagem contribuem para um melhor conhecimento dos aspectos positivos e negativos de cada uma, levando a buscar um melhor desempenho e maior garantia dos resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and Molecular Immunology**. W. B. Saunders Company. Philadelphia, 1994. 457p.
- ALBERT, E. D.; BALNER, H.; COHEN, N.; COLLINS, N. H.; DAVID, C. S.; DORF, M. E.; DUNCAN, W. R.; GECZY, A. F.; GÖTZE, D.; GROSSE-WILDE, H.; GÜNTHER, E.; HALA, K.; IVANYI, P.; KLEIN, J.; STARK, O.; STREILEIN, J. W.; VRIESENDORF, H. M.; deWECK, A. L. **The Major Histocompatibility System in Man and Animals**. Dietrich Gotze Springer-Verlag, p. 1-58, 1977.
- BELICH, M. P.; MADRIGAL, J. A.; HILDEBRAND, W. H.; ZEMMOUR, J.; WILLIAMS, R. C.; LUZ, R.; PETZL-ERLER, M. L. & PARHAM, P. Unusual HLA-B alleles in two tribes of Brazilian Indians. *Nature*, v. 357, p. 326-329, 1992.
- BODMER, J.G.; MARSH, S.G.E.; ALBERT, E.D.; BODMER, W.F.; BONTROP, R.E.; CHARRON, D.; DUPONT, B.; ERLICH, H.A.; MACH, B.; MAYR, W.R.; PARHAM, P.; SASAZUKI, T.; SCHREUDER, G.M.Th.; STROMINGER, J.L.; SVEJGAARD, A.; TERAZAKI, P.I. Nomenclature for factors of the HLA system, 1995. *Human Immunology*, v. 43, p. 149-164. 1995.
- CAMPBELL, R. D.; TROWSDALE, J. Map of the human MHC. *Immunology Today*, v. 14, n. 7, p. 349-352, 1993.
- DAUSSET, J. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol.*, v.20, p. 156, 1958.
- 12° INTERNATIONAL HISTOCOMPATIBILITY WORKSHOP.(Paris, 1994). **Technical handbook**. Paris: HLA et Médecine, (Addendum 1/1995).

- GERAGHTY, D. E. The HLA class I gene family. In: **Proceedings of the Eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference**, Oxford Science Publication, v. 2, p. 129-163, 1992.
- GUERRA, L. K.; REHFELDT, I. R.; LIMA, M. T.; PETZL-ERLER, M. L.; MESSIAS, I. J. T. BF and C3 genetic polymorphisms in Kaingang Indians from Southern Brazil. **Hum. Hered.**, v. 42 (3), p. 153-156, 1992.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning**. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York. 1982. 545p.
- MARSH, S. G. E.; BODMER, J. G. Class II nucleotide sequences, 1992. **Tissue Antigens**, v. 40, p. 229-243, 1992.
- MESSIAS, I. J. T.; PETZL-ERLER, M. L.; REHFELDT, I. R.; LIMA, M. T.; GUERRA, L. K. Variability of BF and C3 among Guarani Indians from Southern Brazil. **Rev. Bras. Genet.**, v. 16 (3), p. 803-809, 1993.
- MORRIS, A.; HEWITT, C.; YOUNG, S. **Molecular aspects of Medicine**: the major histocompatibility complex: its genes and their roles in antigen process. Oxford: Elsevier, 1994.
- ORITA, M.; IWAHANA, H.; KANAZAWA, H.; HAYASHI, K.; SEKIYA, T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel eletrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 2766-2770, 1989.
- PANDO, M.; THEILER, G.; MELANO, R.; PETZL-ERLER, M. L.; SATZ, M. L. A new DR6 allele (DRB1*1413) found in a tribe of Brazilian Indians. **Immunogenetics**, v. 39, p. 377, 1994.

PARHAM, P.; ARNETT, K. L.; ADAMS, E. J.; LITTLE, A. M.; TEES, K.; BARBER, L. D.; MARTINEZ-NAVES, E.; MADRIGAL, A. J.; VULLO, C. M.; CLAYBERGER, C.; LYU, S. C.; MARSH, S. G. E.; GORODEZKY, C.; OHTA, T.; MARKOW, T.; PETZL-ERLER, M. L. Episodic evolution of HLA-B in the indigenous human populations of the New World. **Current Biology** (submetido).

BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS / UFFR

PETZL-ERLER, M. L.; McDEVITT, H. O. Molecular analysis of the HLA-DRB genes in two tribes of Brazilian Indians. **Human Immunology**, v. 43, p. 180-184, 1994.

PETZL-ERLER, M. L.; LUZ, R.; SOTOMAIOR, V. S. The HLA polymorphism of two distinctive South-American Indian tribes: The Kaingang and the Guarani. **Tissue Antigens**, v. 41, p. 227-237, 1993.

PETZL-ERLER, M. L.; GORODEZKY, C.; LAYRISSE, Z.; KLITZ, W.; FAINBOIM, L.; VULLO, C.; BODMER, J.; EGEA, E.; NAVARRETE, C.; INFANTE, E.; ALAEZ, C.; OLIVO, A.; DEBAZ, H.; BAUTISTA, N.; ROSA, G.; VAZQUEZ, M. N.; NAVARRO, J. L.; PUJOL, M. J.; DURAN, C.; SCHAFHAUSER, C.; FAUCZ, F. R.; JANZEN, M.; MACIAG, P. C.; BOLDT, A. B. W.; SOUZA, P. S. A.; PROBST, C. M.; SILVA, G. F.; MAKHATADZE, N.; DOMINGUEZ, E.; MONTAGNI, S.; MATOS, M.; MARTINEZ, A.; HERRERA, F.; HOLLENBACH, J.; THOMSON, G.; PANDO, M.; SATZ, L.; LARRIBA, J.; FERNANDEZ, G.; PESOA, S. A.; BOROSKY, A.; GARAVITO, G.; ANGEL, L.; BROWN, E.; LLOP, E. **Anthropology Component. Report for Region Latin-America: Amerindian and Admixed Populations. HLA 1996.** (submetido).

ROITT, I. M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. São Paulo. Editora Manole Ltda. 1993.

SALZANO, F. M.; CALLEGARI-JACQUES, S. M. **South-American Indians: A Case Study in Evolution**. Oxford: Clarendon Press, 1988.

- SALZANO, F. M.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; WEIMER, T. A.; FRANCO, M. H. L. P.; HUTZ, M. H.; PETZL-ERLER, M. L. Electrophoretic protein polymorphisms in Kaingang and Guarani Indians of Southern Brazil. **American Journal of Human Genetics** (submetido).
- SPIES, T.; BLANCK, G.; BRESNAHAN, M.; SANDS, J.; STROMINGER, J. L. A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. **Science**, v. 243, p. 214-217, 1989.
- WEG-REMER, S.; BRENDEN, M.; SCHWARZ, E.; WITZEL, K.; SCHNEIDER, P. M.; GUERRA, L. K.; REHFELDT, I. R.; LIMA, M. T.; HARTMANN, D.; PETZL-ERLER, M. L.; MESSIAS, I. J. T.; MAUFF, G. Major histocompatibility complex (MHC) class III genetics in two Amerindian tribes from Southern Brazil: the Kaingang and the Guarani. **American Journal of Human Genetics** (submetido).

APÊNDICE

Resultados das tipagens obtidos por PCR-SSCA e PCR-SSO

Amostras da população paranaense mista	Tipagem por PCR-SSCA	Tipagem por PCR-SSO
01 AAF	0102/0102	-
02 ACC	0101/0102	-
03 AQU	0101/0102	-
04 CAF	0101/0101	0101/0101
05 CAO	0101/0102	-
06 CFA	0102/0102	-
07 CLK	0101/0102	-
08 CLL	0101/0102	-
09 CPA	0101/0101	-
10 API	0101/0101	0101/0101
11 CRE	0101/0102	-
12 CSA	0101/0102	-
13 EFM	0101/0102	0101/0102
14 EMB	0102/0102	-
15 ESE	0101/0102	-
16 ETN	0101/0102	0101/0102
17 TFE	0101/0102	0101/0102
18 FRF	0102/0102	0102/0102
19 GFF	0102/0102	0102/0102
20 HHT	0101/0101	0101/0101
21 DCC	0102/0102	0102/0102
22 ISB	0101/0101	0101/0101
24 JCM	0101/0102	0101/0102
25 JFF	0101/0102	0101/0102

Amostras da população paranaense mista	Tipagem por PCR-SSCA	Tipagem por PCR-SSO
26 JML	0101/0102	não identificou
27 JWM	0101/0102	0101/0102
28 LAF	0101/0102	0102/0102
29 LCE	0101/0102	0101/0102
30 LCR	0101/0101	0101/0101
31 LCU	0101/0101	0101/0101
32 LIY	0102/0102	0102/0102
33 LPN	0101/0102	0101/0102
34 LTR	0101/0102	0101/0102
35 LUR	0101/0102	0101/0102
36 MAS	0101/0102	0101/0102
37 MBL	0101/0102	0101/0102
38 MBO	0101/0102	0101/0102
39 MCD	0101/0102	0101/0102
40 MFR	0101/0102	0101/0102
41 MKO	0102/0102	0102/0102
42 MLI	0101/0101	0101/0101
43 MLP	0101/0101	0101/0101 ou 0101/0102
44 MMB	0101/0101	0101/0101
45 MME	0101/0102	0101/0102
46 MMI	0102/0102	0102/0102
47 MPI	0101/0102	0101/0102
48 MRS	0102/0102	0102/0102
49 MSC	0101/0102	0101/0102
50 MSP	0101/0101	0101/0101
51 PCM	0101/0102	0101/0102
52 PGO	0101/0101	0101/0101
53 REK	0101/0102	0101/0102

Amostras da população paranaense mista	Tipagem por PCR-SSCA	Tipagem por PCR-SSO
54 RLP	0101/0102	0101/0102
55 RLE	0101/0101	0101/0101
56 RMU	0101/0101	0101/0101
57 RPA	0101/0101	0101/0101
58 SCP	0102/0102	0102/0102
59 SLE	0101/0102	0101/0102
60 SMA	0101/0101	0101/0101
61 JRJ	0101/0102	0101/0102
62 MOJ	0102/0102	0102/0102
63 PSS	0101/0101	0101/0101
64 FPO	0101/0102	0101/0102
65 JGA	0101/0101	0101/0101
66 NAM	0101/0102	0101/0102
67 ROP	0101/0101	0101/0101
67II RRS	0101/0102	0101/0102
68 AJA	0101/0102	0101/0102
68II NBP	0101/0102	0101/0102
69 OPA	0101/0101	0101/0101
69II DCS	0101/0102	0101/0102
70 TPA	0101/0101	0101/0101
70II LAZ	0101/0101	0101/0101
71 MCJ	0101/0102	0101/0102
72 YBA	0101/0101	0101/0101
72II LSS	0102/0102	0102/0102
73 YBB	0101/0102	0101/0102
73II KPL	0101/0102	0101/0102
74 KAB	0101/0101	0101/0101
75 NPA	0101/0101	0101/0101

Amostras da população paranaense mista	Tipagem por PCR-SSCA	Tipagem por PCR-SSO
76 AVA	0102/0102	0102/0102
77 MOT	0101/0101	0101/0101
78 SBA	0102/0102	0102/0102
79 CPS	0102/0102	0102/0102
80 JSI	0101/0102	0101/0102
81 SSI	0101/0102	0101/0102
82 SMC	0101/0102	0101/0102
83 IHH	0101/0102	0101/0102
84 LMS	0101/0102	0101/0102
85 LLI	0102/0102	0102/0102
86 RCB	0101/0101	0101/0101
87 EOY	0101/0101	0101/0101
88 JMD	0101/0101	0101/0101
89 ROB	0101/0102	0101/0102
90 DAM	0101/0101	0101/0101
91 EPB	0101/0101	0101/0101
92 JSS	0101/0102	0101/0102
93 GFS	0101/0102	0101/0102
95 NTR	0101/0102	0101/0102
96 ALS	0101/0102	0101/0102
97 CRB	0102/0102	0102/0102
99 ABB	0101/0101	0101/0101
100 VSR	0101/0101	0101/0101
101 VKC	0101/0101	0101/0101
102 MIA	0101/0102	0101/0102
103 GLD	0101/0101	0101/0101
104 PAD	0101/0102	0101/0102
105 LFE	0101/0101	0101/0101

Amostras da população paranaense mista	Tipagem por PCR-SSCA	Tipagem por PCR-SSO
106 MSI	0101/0102	0101/0102
107 ANS	0101/0101	0101/0101
108 JRO	0101/0102	-
109 MLC	0101/0102	-
110 NNO	0101/0102	-
111 CMP	0101/0101	-
112 SAS	0101/0102	-
113 RIC	0101/0101	-
117 ACS	0101/0102	-
118 MRZ	0101/0102	-
119 LEO	0101/0101	-
121 JBG	0101/0102	-
122 VRJ	0101/0101	-
126 MAB	0102/0102	-
127 LKB	0101/0102	-
128 JMR	0101/0101	-
131 JGR	0101/0101	-
132 FGJ	0101/0101	-
133 ETO	0102/0102	-
134 EFR	0101/0101	-
137 DAC	0101/0101	-
138 SMF	0101/0102	-
139 LUK	0101/0102	-
140 MFL	0101/0101	-
141 ACS	0101/0101	-
142 MBE	0101/0101	-
143 EKH	0101/0101	-
144 VLC	0102/0102	-

Amostras da população paranaense mista	Tipagem por PCR-SSCA	Tipagem por PCR-SSO
145 SFS	0101/0101	-
146 STU	0101/0102	-
147 FMO	0102/0102	-

Amostras de indígenas KRC	Tipagem por PCR-SSCA	Tipagem por PCR-SSO
KRC 001	0101/0102	0101/0102
KRC 002	0102/0102	0102/0102
KRC 003	0101/0101	0101/0101
KRC 004	0101/0102	0101/0102
KRC 006A	0102/0102	0102/0102
KRC 006B	0102/0102	0102/0102
KRC 007	0101/0102	0101/0102
KRC 008	0101/0102	0101/0102
KRC 009	0102/0102	0102/0102
KRC 010	0102/0102	0102/0102
KRC 011	0102/0102	0102/0102
KRC 012	0102/0102	0102/0102
KRC 013	0101/0102	0101/0102
KRC 014	0101/0102	0101/0102
KRC 015	0101/0102	0101/0102
KRC 016	0101/0102	0101/0102
KRC 017	0102/0102	0102/0102
KRC 018	0101/0102	0102/0102
KRC 019	0101/0101	0101/0101
KRC 020	0102/0102	0102/0102
KRC 021	0101/0101	0101/0101
KRC 022	0101/0101	0101/0101
KRC 023	0101/0102	0101/0102
KRC 024	0101/0102	0101/0102
KRC 025	0101/0102	0101/0102
KRC 026	0101/0102	0101/0101 ou 0101/0102
KRC 028	0101/0102	0101/0102
KRC 029	0101/0102	0101/0102

Amostras de indígenas KRC	Tipagem por PCR-SSCA	Tipagem por PCR-SSO
KRC 030	0102/0102	0102/0102
KRC 031	0101/0101	0101/0101
KRC 032	0102/0102	0102/0102
KRC 033	0102/0102	0102/0102
KRC 034	0101/0102	0101/0102
KRC 035	0101/0101	0101/0101
KRC 036	0101/0102	0101/0102
KRC 038	0101/0102	0101/0102
KRC 039	0102/0102	0102/0102
KRC 040	0101/0101	0101/0101
KRC 041	0101/0102	0101/0102
KRC 042	0101/0101	0101/0101
KRC 043	0101/0101	0101/0101
KRC 044	0101/0102	0102/0102
KRC 045	0101/0102	0101/0102
KRC 046	0101/0102	0101/0102
KRC 047	0102/0102	0102/0102
KRC 049	0102/0102	0102/0102
KRC 049cr	0102/0102	0102/0102
KRC 050	0101/0102	0101/0102
KRC 051	0101/0102	0101/0102
KRC 052	0101/0102	0101/0102
KRC 053	0101/0102	0101/0102
KRC 054	0101/0102	0101/0102
KRC 055	0102/0102	0101/0102
KRC 057A	0101/0102	0101/0102
KRC 057B	0101/0102	0101/0102
KRC 058	0102/0102	0102/0102

Amostras de indígenas KRC	Tipagem por PCR-SSCA	Tipagem por PCR-SSO
KRC 059	0101/0102	-
KRC 060	0101/0102	-
KRC 061	0102/0102	-
KRC 062	0102/0102	-
KRC 063	0101/0101	-
KRC 064	0102/0102	-
KRC 065	0101/0102	-
KRC 066	0101/0102	-
KRC 067	0102/0102	-
KRC 068	0102/0102	-
KRC 069	0102/0102	-
KRC 070	0101/0101	-
KRC 071	0101/0102	-
KRC 072	0101/0102	-
KRC 073	0102/0102	-
KRC 074	0101/0101	-
KRC 075	0101/0101	-
KRC 076	0101/0102	-
KRC 077	0102/0102	-
KRC 078	0101/0102	-
KRC 079	0101/0101	-
KRC 080	0101/0102	-
KRC 081	0102/0102	-
KRC 082	0101/0102	-
KRC 083	0101/0102	-
KRC 084	0101/0102	-
KRC 085	0101/0102	-
KRC 086	0101/0102	-

Amostras de indígenas KRC	Tipagem por PCR-SSCA	Tipagem por PCR-SSO
KRC 087	0101/0101	-
KRC 088	0101/0102	-
KRC 089	0101/0101	-
KRC 090	0101/0102	-
KRC 092	0102/0102	-
KRC 093	0101/0102	-
KRC 094	0101/0101	-
KRC 095	0101/0102	-
KRC 096	0102/0102	-
KRC 097	0101/0101	-
KRC 098	0101/0102	-
KRC 099	0102/0102	-
KRC 100	0102/0102	-
KRC 101	0102/0102	-
KRC 102	0102/0102	-
KRC 103	0101/0102	-
KRC 104	0101/0102	-
KRC 105	0102/0102	-
KRC 106	0102/0102	-
KRC 107	0102/0102	-
KRC 108	0101/0102	-
KRC 109	0101/0101	-
KRC 111	0101/0102	-
KRC 112	0101/0102	-
KRC 113	0101/0101	-

Amostras de indígenas KIV	Tipagem por PCR-SSCA	Tipagem por PCR-SSO
KIV 001	0101/0101	0101/0101
KIV 002	0101/0101	0101/0101
KIV 003	0101/0101	0101/0101
KIV 004	0101/0102	0101/0102
KIV 005	0101/0101	0101/0101
KIV 006	0102/0102	0102/0102
KIV 007	0101/0102	0101/0102
KIV 008	0102/0102	0102/0102
KIV 009	0102/0102	0102/0102
KIV 010	0102/0102	0102/0102
KIV 011	0101/0102	0101/0102
KIV 012	0101/0102	0101/0102
KIV 013	0102/0102	0102/0102
KIV 014	0101/0102	0101/0102
KIV 015	0101/0102	0101/0102
KIV 016	0101/0102	0101/0102
KIV 017	0101/0102	0101/0102
KIV 018	0101/0102	0101/0102
KIV 019	0101/0102	-
KIV 020	0101/0101	0101/0101
KIV 021	0101/0102	0101/0102
KIV 022	0101/0102	0101/0102
KIV 023	0101/0102	0101/0102
KIV 024	0101/0102	0101/0102
KIV 025	0102/0102	0102/0102
KIV 026	0102/0102	0102/0102
KIV 027	0101/0102	0102/0102
KIV 028	0101/0102	0101/0102

Amostras de indígenas KIV	Tipagem por PCR-SSCA	Tipagem por PCR-SSO
KIV 029	0102/0102	0102/0102
KIV 030	0102/0102	0102/0102
KIV 031	0101/0101	0101/0101
KIC 032	0101/0101	0101/0101
KIV 033	0101/0102	0101/0102
KIV 034	0101/0102	0101/0101
KIV 035	0101/0102	0101/0102
KIV 036	0102/0102	0102/0102
KIV 037	0101/0101	0101/0101
KIV 038	0101/0101	0101/0102
KIV 039	0102/0102	0102/0102
KIV 040	0101/0102	0101/0102
KIV 041	0101/0102	0101/0102
KIV 042	0102/0102	0102/0102
KIV 043	0101/0101	0101/0101
KIV 044	0101/0101	0101/0101
KIV 045	0102/0102	0102/0102
KIV 046	0101/0102	0101/0102
KIV 047	0102/0102	0102/0102
KIV 048	0102/0102	0102/0102
KIV 049	0101/0102	0101/0102
KIV 050	0102/0102	0102/0102
KIV 051	0101/0102	0101/0102
KIV 052	0101/0102	0101/0102
KIV 053	0101/0102	0101/0102
KIV 054	0101/0101	0101/0101
KIV 055	0101/0102	0101/0102
KIV 056	0101/0101	0101/0101

Amostras de indígenas KIV	Tipagem por PCR-SSCA	Tipagem por PCR-SSO
KIV 057	0101/0101	0101/0101
KIV 058	0101/0102	-
KIV 059	0101/0101	-
KIV 060	0101/0101	-
KIV 061	0101/0102	-
KIV 062	0101/0102	-
KIV 063	0101/0101	-
KIV 064	0101/0102	-
KIV 065	0101/0102	-
KIV 066	0102/0102	-
KIV 067	0101/0101	-
KIV 068	0101/0102	-
KIV 069	0101/0102	-
KIV 070	0101/0101	-
KIV 071	0101/0102	-
KIV 072	0101/0102	-
KIV 073	0101/0102	-
KIV 075	0101/0102	-
KIV 076	0101/0101	-
KIV 077	0101/0101	-
KIV 078	0101/0101	-
KIV 079	0101/0101	-
KIV 080	0101/0102	-
KIV 081	0102/0102	-
KIV 082	0101/0102	-
KIV 083	0101/0102	-
KIV 084	0101/0101	-
KIV 085	0102/0102	-

Amostras de indígenas KIV	Tipagem por PCR-SSCA	Tipagem por PCR-SSO
KIV 086	0102/0102	-
KIV 087	0101/0101	-
KIV 088	0101/0102	-
KIV 089	0102/0102	-
KIV 090	0101/0102	-
KIV 091	0102/0102	-
KIV 092	0101/0101	-
KIV 093	0101/0102	-
KIV 094	0102/0102	-
KIV 095	0102/0102	-
KIV 096	0101/0101	-
KIV 097	0102/0102	-
KIV 098	0102/0102	-
KIV 099	0101/0102	-
KIV 100	0102/0102	-
KIV 101	0101/0101	-
KIV 102	0101/0102	-
KIV 103	0101/0102	-
KIV 104	0102/0102	-
KIV 105	0101/0102	-
KIV 106	0102/0102	-
KIV 107	0101/0102	-
KIV 108	0101/0102	-
KIV 109	0101/0102	-
KIV 110	0101/0102	-
KIV 111	0101/0102	-
KIV 112	0101/0102	-
KIV 113	0102/0102	-

Amostras de indígenas KIV	Tipagem por PCR-SSCA	Tipagem por PCR-SSO
KIV 114	0101/0102	-
KIV 115	0101/0102	-
KIV 116	0101/0102	-
KIV 117	0102/0102	-
KIV 118	0102/0102	-
KIV 119	0101/0102	-
KIV 120	0101/0101	-
KIV 121	0101/0101	-
KIV 122	0101/0102	-
KIV 123	0101/0101	-
KIV 124	0101/0102	-
KIV 125	0101/0101	-
KIV 126	0101/0102	-
KIV 128	0102/0102	-
KIV 129	0102/0102	-
KIV 130	0101/0102	-
KIV 131	0102/0102	-

Amostras de indígenas GRC	Tipagem por PCR-SSCA	Tipagem por PCR-SSO
GRC 131	0101/0102	0101/0102
GRC 132	0101/0101	0101/0101
GRC 133	0101/0102	0101/0102
GRC 134	0101/0102	0101/0102
GRC 135	0102/0102	0102/0102 ou 0101/0102
GRC 136	0101/0102	0101/0102
GRC 137	0101/0102	0101/0102
GRC 138	0101/0102	0101/0102
GRC 139	0101/0102	0101/0102
GRC 140	0101/0102	-
GRC 141	0102/0102	0102/0102
GRC 142	0101/0102	0101/0102
GRC 143	0101/0101	0101/0101
GRC 144	0101/0101	0101/0101
GRC 145	0101/0101	0101/0101
GRC 146	0101/0102	0101/0102
GRC 147	0101/0102	0101/0102
GRC 148	0101/0101	0101/0101
GRC 149	0102/0102	0102/0102
GRC 150	0101/0102	0101/0102
GRC 151	0101/0102	0101/0102
GRC 152	0101/0101	0101/0101
GRC 153	0101/0101	não identificou
GRC 154	0101/0102	0101/0102
GRC 155	0101/0102	0101/0102
GRC 157	0101/0102	0101/0101
GRC 158	0101/0102	0102/0102
GRC 159	0101/0102	0101/0102

Amostras de indígenas GRC	Tipagem por PCR-SSCA	Tipagem por PCR-SSO
GRC 160	0101/0101	0101/0101
GRC 161	0101/0101	0101/0101
GRC 162	0101/0102	0101/0102
GRC 163	0101/0102	0102/0102
GRC 164	0101/0102	0101/0102
GRC 165	0101/0101	0101/0101
GRC 166	0101/0102	0101/0102
GRC 167	0101/0102	0102/0102
GRC 168	0101/0101	0101/0101
GRC 169	0101/0101	0101/0101
GRC 170	0101/0102	0101/0102
GRC 171	0101/0101	0101/0101
GRC 172	0102/0102	0102/0102
GRC 173	0101/0102	0101/0102
GRC 174	0101/0101	0101/0101
GRC 177A	0101/0102	0101/0102
GRC 177B	0101/0101	0101/0101
GRC 178	0101/0102	0101/0102
GRC 179	0101/0101	0101/0101
GRC 180	0101/0102	0101/0102
GRC 181	0101/0102	0101/0102
GRC 182	0101/0102	0101/0102
GRC 184	0101/0101	0101/0101
GRC 185	0101/0102	0101/0102
GRC 186	0101/0101	0101/0101
GRC 188	0101/0101	0101/0101
GRC 189	0101/0101	0101/0101
GRC 190	0101/0102	0101/0102

Amostras de indígenas GRC	Tipagem por PCR-SSCA	Tipagem por PCR-SSO
GRC 191	0101/0101	0101/0101 ou 0101/0102
GRC 192	0102/0102	-
GRC 193	0101/0101	-
GRC 194	0101/0101	-
GRC 195	0101/0102	-
GRC 196	0101/0101	-
GRC 198	0101/0101	-
GRC 199	0101/0101	-
GRC 200	0101/0102	-
GRC 201	0101/0101	-
GRC 202	0101/0101	-
GRC 203	0101/0101	-
GRC 204	0101/0101	-
GRC 205	0101/0101	-
GRC 206	0101/0101	-
GRC 207	0102/0102	-
GRC 208	0101/0102	-
GRC 209	0101/0102	-
GRC 210	0101/0101	-
GRC 211	0101/0101	-
GRC 212	0101/0101	-
GRC 213	0101/0102	-
GRC 214	0101/0102	-
GRC 215	0101/0101	-
GRC 216	0101/0102	-
GRC 217	0101/0102	-
GRC 218	0101/0102	-
GRC 219	0101/0101	-

Amostras de indígenas GRC	Tipagem por PCR-SSCA	Tipagem por PCR-SSO
GRC 221	0101/0101	-
GRC 222	0101/0102	-
GRC 225	0101/0102	-
GRC 227	0101/0101	-
GRC 228	0101/0102	-
GRC 229	0101/0101	-
GRC 230	0101/0101	-
GRC 231	0101/0102	-